

Aus dem Institut für Hygiene der Universität Düsseldorf
und dem Medizinischen Institut für Lufthygiene und
Silikoseforschung an der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. med. Hans-Werner Schlipkötter

Abteilung für Experimentelle Pathologie
Leiter: Professor Dr. med. Werner Hilscher

VERGLEICHENDE AUTORADIOGRAPHISCHE
UNTERSUCHUNGEN ZUR KINETIK
FETALER WEIBLICHER UND MÄNNLICHER
GONIEN DES MODELLTIERES RATTE
ZWISCHEN DEN TAGEN 15.6 UND 17.0
POST CONCEPTIONEM (P.C.)

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

IPHIGENIE BRANDENBUSCH

1980

Aus dem Institut für Hygiene der Universität Düsseldorf
und dem Medizinischen Institut für Lufthygiene und
Silikoseforschung an der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. med. Hans-Werner Schlipköter

Abteilung für Experimentelle Pathologie
Leiter: Professor Dr. med. Werner Hilscher

VERGLEICHENDE AUTORADIOGRAPHISCHE
UNTERSUCHUNGEN ZUR KINETIK
FETALER WEIBLICHER UND MÄNNLICHER
GONIEN DES MODELLTIERES RATTE
ZWISCHEN DEN TAGEN 15.6 UND 17.0
POST CONCEPTIONEM (P.C.) *)

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

IPHIGENIE BRANDENBUSCH

1980

*) mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez. Prof. Dr. med. Krüskemper

Referent
gez. Prof. Dr. med. Hilscher

Korreferent
gez. Prof. Dr. med. Hofmann

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1) Überblick	1
2) Fragestellung	5
Material und Methodik	7
Ergebnisse	10
Diskussion	13
Zusammenfassung	19
Literatur	21
Tabellen	24
Figuren	27

Einleitung

=====

1) Überblick

Die Entwicklung der weiblichen und männlichen Geschlechtszellen (Gametogenese) beim Menschen und Säugetier läßt sich in drei große Etappen unterteilen (Hilscher et al. 1974): 1. die prägonadale Etappe, 2. die Oogenese bzw. PräspERMatogenese, 3. die Follikulogenese bzw. Spermatogenese.

1. Die prägonadale Etappe

Urkeimzellen (primordiale Geschlechtszellen), die beim Menschen reichlich Glykogen und alkalische Phosphatase enthalten (Falin 1969) sowie Mitochondrien vom tubulären Typ besitzen (Wartenberg 1974, 1976), führen mehrere mitotische Teilungen durch. Diese unreifen Geschlechtszellen wandern vom Entoderm her in die entstehenden Gonaden ein (Rauh 1929).

2. Die Oogenese bzw. PräspERMatogenese

Aus den primordialen Geschlechtszellen entwickeln sich Gonien. Beim Menschen wurde nachgewiesen, daß sich in ihnen wenig bis gar kein Glykogen und alkalische Phosphatase finden und ihre Mitochondrien dem Cristae-Typ angehören. Bei der Ratte sind die Gonien durch eine deutlich positive Reaktion des "Markerenzym" Thiaminpyrophosphatase (TPP-ase) gekennzeichnet, das sich im Bereich des Golgi-Feldes befindet, sowie durch eine starke positive Reaktion der alkalischen Phosphatasen (Hil-

scher et al. 1979). Die sich weiter teilenden und so rasch vermehrenden Gonien heißen in der weiblichen Gonade Oogonien, in der männlichen M-(multiplying) Prospermatogonien (Hilscher et al. 1974, 1976, Wartenberg 1976). Nach mehreren Teilungen entstehen aus der letzten Gonien-Generation die Oocyten bzw. T_1 -(primary transitional) Prospermatogonien. Beim Menschen liegen bisher nur spärliche und unzureichende Angaben über die frühesten Stadien der Oocyten und T_1 -Prospermatogonien vor. Bei der Ratte sind die neu entstandenen Oocyten und T_1 -Prospermatogonien durch kleine Kerne mit groben, an die Kernmembran angelagerten Chromatinbröckchen gekennzeichnet. Die Oogenese endet, nachdem die Oocyten in das Dictyotänstadium der meiotischen Prophase getreten sind. Menschliche Oocyten bleiben im Diplotänstadium. Die Chromosomen sollen aber nach Baker (1972) eine Form annehmen, die den Lampenbürstenchromosomen der Amphibienooocyten ähnelt. Lampenbürstenchromosomen bestehen aus einem zentralen Achsenfaden, auf dem in unregelmäßigen Abständen die Chromomeren aufgereiht sind. Aus der Mehrzahl der Chromomeren entspringen Lateralschleifen, und zwar entweder einzeln oder als Paar. Im Zustand des Lampenbürstenstadiums bzw. dessen Äquivalents sollen die Oocyten große Mengen von informatorischer und ribosomaler RNA bilden. Diese RNA soll für die nach der Befruchtung stattfindende Entwicklung der Cygote bis zur

Gastrulation verantwortlich sein. Diplotäne Rattenoozyten durchlaufen kein Lampenbürstenstadium, gehen dafür aber allmählich in das Dictyotänstadium über, in welchem der Kern einem Interphasenkern ähnlich sieht. Die T_1 -Prospermatogonien verbleiben im Gonienzustand, wobei sie allmählich in die "Kappenphase" (Hilscher und Schulze 1977) übergehen, die sich durch die einer Kappe ähnelnde perinukleäre Anordnung der Mitochondrien auszeichnet, wie sie schon Rauh (1929) als "lockkappenähnliches Chondriom" beschrieb. Durch Mitose gehen aus den T_1 -Prospermatogonien die T_2 -(secondary transitional) Prospermatogonien hervor, die sich durch erneute mitotische Teilung zu A-Spermatogonien differenzieren, mit deren Auftreten die dritte Etappe der Gametogenese beginnt.

3. Die Follikulogenese bzw. Spermatogenese

Während im Ovar die Oocyten im Diplotän- bzw. Dictyotänstadium verharren, beginnen die Prägranulosazellen zu proliferieren. Kurz vor dem Follikelsprung treten die Oocyten in das Diakinesestadium und durchlaufen danach rasch die beiden Reifeteilungen, wodurch je eine haploide Eizelle und drei haploide Polkörperchen entstehen.

Im Testis vermehren sich die Gonien ständig, und zwar entstehen aus den Stammspermatogonien, das sind undifferenzierte A-Spermatogonien, durch Teilung sowohl neue Stammspermatogonien als auch differenzierte A-Spermatogonien sowie Im-Spermatogonien (Intermediär-Spermatogo-

nien) und B-Spermatogonien. Durch Teilung der B-Spermatogonien, der letzten Spermatogonien-Generation, entwickeln sich Spermatocyten erster Ordnung (I-Spermatocyten). Aus diesen gehen durch die erste Reifeteilung Spermatocyten zweiter Ordnung (II-Spermatocyten) hervor, aus denen durch die zweite Reifeteilung Spermatiden entstehen. Durch allmähliche Transformation bilden sich schließlich aus den relativ undifferenzierten Spermatiden die hochdifferenzierten bewegungsfähigen Spermatozoen.

Bei der Ratte entstehen die Gonaden um den 11. Tag post conceptionem (p.c.). Bis zum 14. Tag p.c. sind sie zunächst nicht als weiblich bzw. männlich zu identifizieren. Ab dem 15. Tag p.c. ist deutlich zu erkennen, ob es sich um eine weibliche oder männliche Gonade handelt. Die Oogonien und M-Prospermatogonien treten bereits vorher, um den 14. Tag p.c., auf. Etwa um den 17. Tag p.c. tritt die letzte Generation der Oogonien bzw. M-Prospermatogonien in die Mitose. Ab dem 19. Fetaltag kommen in den Gonaden nur noch Oocyten bzw. T_1 -Prospermatogonien vor. Die Oocyten erreichen um den 3. Tag post natum (p.n.) das Dictyotänstadium. Aus den T_1 -Prospermatogonien entstehen um den 5. Tag p.n. die T_2 -Prospermatogonien und aus diesen am 6. Tag p.n. die A-Spermatogonien.

2) Fragestellung

Die Untersuchungen von Hilscher und Hilscher (1978) ergaben, daß bei der Ratte nach dem 17. Fetaltag die S-Phasen-Dauer der Oogonien und M-Prospermatogonien in der Größenordnung von 10.0 bis 12.5 Stunden liegt und die minimale Generationszeit 16.5 bis 18.0 Stunden beträgt. Das bei diesen Zeitbestimmungen angewandte Verfahren war die Methode der markierten Mitosen von Quastler und Sherman (1959).

Quastler und Sherman gingen von der Tatsache aus, daß eine proliferierende Zelle, nachdem sie durch die Mitose (M) ihrer Mutterzelle entstanden ist, die erste Ruhephase (G_1 -Phase) durchläuft, dann die DNA-Synthese-Phase (S-Phase), um nach der zweiten Ruhephase (G_2 -Phase) selbst in die Mitose (M) zu treten, in der sich aus ihr zwei Tochterzellen entwickeln (Fig. 1). Wenn sich eine Zelle in der S-Phase befindet, kann sie ^3H -Thymidin in ihre DNA einbauen und so markiert werden. Durch Variieren des Intervalls zwischen der stets zur gleichen Tageszeit stattfindenden Injektion von ^3H -Thymidin und der Tötung der Tiere kann man die Wanderung der in der S-Phase markierten Zellen über die Mitose verfolgen, indem man den Prozentsatz markierter Mitosen pro Zeitpunkt bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit sollte festgestellt werden, in welcher Größenordnung die S-Phasen-Dauer und die Gene-

rationszeit der Oogonien und M-Prospermatogonien vor dem 17. Fetaltag liegen und ob zwischen der Kinetik der weiblichen und männlichen Gonien Unterschiede bestehen. Angewandt wurde ein modifiziertes Verfahren der Methode der markierten Mitosen, bei dem der Tötungstermin konstant war und die Injektionstermine variierten (Fig. 2).

Eine weitere Untersuchung diente der Berechnung der "Growth-Fraction" (GF). Mendelsohn (1962) hatte darauf aufmerksam gemacht, daß bei Tumoren nur ein Teil aller Zellen, die sogenannte "Growth-Fraction" (GF), proliferiert, während die übrigen Zellen keine phasischen Veränderungen mehr zeigen. Er definierte:

$$GF = \frac{\text{proliferierende Zellen}}{\text{alle Zellen}}$$

Die Zellen, die sich durch Sauerstoffmangel, chromosomale Schäden u.ä. nicht weiter teilen, bilden die "non-Growth-Fraction" (Hempel 1968).

Material und Methodik

Die Versuche wurden an Albinoratten (Wistar WU-Inzuchtstamm Müller-Haan aus dem Medizinischen Institut für Lufthygiene und Silikoseforschung) vorgenommen.

Zur Zeugung von Rattenfeten wurden zwei männliche Tiere im Alter von fünf Monaten über Nacht zu zwei bis sechs gleichalten weiblichen Ratten in einen Käfig gesetzt. Am folgenden Morgen wurden die Weibchen in Einzelkäfige gebracht und von nun an alle drei Tage gewogen. Eine kontinuierliche Gewichtszunahme zeigte die Trächtigkeit an. Der Tag der Trennung von den Männchen galt als erster Trächtigkeitstag = erster Tag post conceptionem (p.c.). Genau am 17. Tag p.c. um zwölf Uhr mittags wurden die trächtigen Tiere und ihre Feten getötet. Im Abstand von 1 bis 34 Stunden vor diesem Termin hatten die Muttertiere eine einmalige intraperitoneale Gabe von 2000 μ C pro 300 g Ratte ^3H -Thymidin (5000 mC/mmol; Radiochemical Amersham Buckinghamshire, England) erhalten. Die Feten wurden in Bouinscher Lösung fixiert und in Paraplast eingebettet. Dann wurden vom Bauchsegment 5 μ dicke Serienschritte angefertigt. Zur Auswertung gelangten von jedem Wurf sowohl die rechte als auch die linke Gonade von normalerweise je drei, mindestens aber - wenn ein Wurf nur zwei Tiere weiblichen bzw. männlichen Geschlechts enthielt - je zwei weiblichen und männlichen Feten.

Im Anschluß an die Herstellung der Schnitte erfolgte die Anfertigung der Autoradiogramme, d.h. die Schnitte wurden mit K-2-Emulsion (Ilford, Essex) 21 Tage lang exponiert, entwickelt, fixiert und mit Hämalaun durch die Emulsionsschicht gefärbt. Pro Gonade wurden je hundert Metaphasen von Gonien daraufhin untersucht, ob sie markiert waren oder nicht. Eine Metaphase mit mehr als drei Körnern pro Kern galt als markiert. Die durchschnittliche Silberkornzahl pro markierter Metaphase lag zwischen zehn und zwanzig. Bei denjenigen Präparaten, bei denen die Silberkornzahl pro markierter Metaphase weit über zwanzig lag, wurde eine Metaphase erst mit mehr als fünf Körnern pro Kern als markiert gezählt. Jeder angegebene Wert pro Termin bezieht sich somit auf die Auswertung von normalerweise sechshundert, mindestens aber vierhundert Metaphasen von Oogonien bzw. M-Prospermatogonien.

Um den Prozentsatz markierter Interphasen zu bestimmen, wurden je drei weibliche und drei männliche Gonaden aus zwei Würfen untersucht. Das Muttertier des ersten Wurfs hatte eine Stunde, das des zweiten 22 Stunden vor der Tötung ^3H -Thymidin erhalten. Es wurde geprüft, ob die Interphasen der Geschlechtszellen (1000 Interphasen von Oogonien bzw. M-Prospermatogonien pro Gonade) markiert waren oder nicht.

Zur Bestimmung des Mitoseindex wurden an einem Ovar

und an einem Testis je 1000 Geschlechtszellen daraufhin untersucht, wie viele von ihnen degeneriert waren bzw. sich in der Rekonstruktionsphase, Postmitose, Interphase oder einer der Mitosephasen - früher Prophase, später Prophase, Metaphase, Anaphase, Telophase - befanden. Die Mitosephasen einschließlich der Telophasen galten als eine Zelle. Von der Rekonstruktionsphase an wurde jede der beiden Tochterzellen als Einzelzelle gewertet.

Ergebnisse

=====

Der Prozentsatz markierter Metaphasen an der Anzahl aller ausgewerteten Metaphasen von Oogonien und M-Prospermatogonien wurde in Fig. 5 als Funktion der Zeit zwischen der Injektion von ^3H -Thymidin und der Tötung der Tiere in Form von Kurven aufgezeichnet. Dabei sieht man, daß die erste Welle der Kurve markierter Oogonien steiler ansteigt und nach kürzerer Zeit wieder abfällt als die erste Welle der Kurve markierter M-Prospermatogonien, während die zweiten Wellen der entsprechenden Kurven fast gleichartig verlaufen.

Die Werte für die Dauer der DNA-Synthese-Phase (S-Phase) und der Generationszeit (T_c = generation cycle time) wurden an den von Hand ausgeglichenen Kurven ermittelt.

Die S-Phasen-Dauer wurde nach dem "halbe Höhe-Verfahren" von Wimber und Quastler (1963) bestimmt: bei 50 % des Kurvenmaximums der ersten Welle auf der Ordinate wird der Abstand zwischen dem ansteigenden und dem abfallenden Schenkel der Kurve auf die Abszisse projiziert und dort die Dauer der S-Phase in Stunden (h) abgelesen. Hierbei ergab sich für die Oogonien ein Wert von $S = 11.8$ h und für die M-Prospermatogonien $S = 12.9$ h. Außerdem wurde die S-Phasen-Dauer noch nach dem "Fläche unter Kurve-Verfahren" durch Integration der Fläche unter der ersten Welle der Kurve berechnet. Mit dieser

Methode hatten schon Hilscher et al. (1972) die S-Phasen-Dauer der T_1 -Prospermatogonien ermittelt. Mit Hilfe der Integration ergaben sich Werte von $S = 11.8$ h für die Oogonien bzw. von $S = 12.5$ h für die M-Prospermatogonien.

Die Dauer der Generationszeit T_c erhält man, indem man den Abstand zwischen den Schwerpunkten der beiden Wellen einer Kurve bestimmt (Hilscher, Hilscher, Maurer 1969). Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten weiblichen Geschlechtszellen fand man so eine Generationszeit von 17.3 h, bei den männlichen Geschlechtszellen ergab sich für T_c ein Wert von 16.9 h.

Wenn man das Produkt aus der Generationszeit und dem Mitoseindex bildet, bekommt man den Wert der Mitosedauer (Quastler 1963). Aus Tabelle 2 ist abzulesen, daß der Prozentsatz in Mitose befindlicher Geschlechtszellen am 17. Tag p.c. (von Prophasen bis einschließlich Telophasen) an der Gesamtzahl ausgewerteter Geschlechtszellen bei den Oogonien 11 %, bei den M-Prospermatogonien 12 % beträgt. Der Mitoseindex der weiblichen Zellen ist also 0.11, der der männlichen 0.12. Berechnet man nun das Produkt aus Generationszeit und Mitoseindex, so ergibt sich für die Oogonien eine Mitosedauer von 2.1 h und für die M-Prospermatogonien eine Mitosedauer von 1.9 h.

Beim ersten Wurf, dessen Muttertier eine Stunde vor der Tötung ^3H -Thymidin erhalten hatte, betrug der An-

teil markierter Interphasen bei den weiblichen Gonien 53 %, bei den männlichen 56 %. Beim zweiten Wurf, dessen Muttertier 22 Stunden vor der Tötung ^3H -Thymidin injiziert bekommen hatte, betrug der Prozentsatz markierter Interphasen bei den Oogonien 52 %, bei den M-Prospermatogonien 55 %.

Zur Berechnung der Growth-Fraction (GF) wurde die von Post und Hoffman (1964) erstellte Formel benutzt:

$$GF = \frac{\text{Generationszeit} \cdot \% \text{ markierte Interphasen}}{\text{DNA-Synthese-Phase}}$$

Für die Oogonien der Feten des ersten Wurfs ergab sich somit aus $\frac{17.3 \text{ h} \cdot 53 \%}{11.8 \text{ h}}$ eine GF von 77.7 % und für die M-Prospermatogonien aus $\frac{16.9 \text{ h} \cdot 56 \%}{12.5 \text{ h}}$ eine GF von 75.7 %.

Diskussion

=====

In den meisten deutschsprachigen Lehrbüchern der Embryologie und Histologie wird beschrieben, daß die Oocyten bzw. Spermatocyten durch Umwandlung von Oogonien bzw. Spermatogonien entstehen, die ihre Teilung eingestellt haben (Fig. 4). Diese Darstellung widerspricht aber den Befunden von Leblond und Clermont (1952), Oakberg (1956), Monesi (1962) und Hilscher, Hilscher, Maurer (1969), die einwandfrei nachweisen konnten, daß die Spermatocyten durch Teilung aus der letzten Spermatogonien-Generation, den B-Spermatogonien, hervorgehen. Auch für die Oocyten und ihre männliche Paralleelpopulation, die T_1 -Prospermatogonien, konnten Hilscher et al. (1974) nachweisen, daß sie durch Teilung aus der letzten Oogonien- bzw. M-Prospermatogonien-Generation hervorgehen.

Die von Hilscher und Hilscher (1978) gefundenen Kurvenverläufe markierter Prophasen, Metaphasen und Postmitosephasen (Fig. 6 a,b,c) legen den Schluß nahe, daß in den weiblichen und männlichen Gonaden zur gleichen Zeit markierte Mitosen verschiedener Generationen von Oogonien bzw. M-Prospermatogonien vorkommen. Bei diesen Untersuchungen war ursprünglich davon ausgegangen worden, daß ein zweites Maximum markierter Mitosen nicht auftritt, weil aus der letzten Generation der Oogonien bzw. M-Prospermatogonien Oocyten bzw. T_1 -Prospermatogonien hervorgehen, die wegen ihrer langen Generationszeit kei-

ne normale Mitose innerhalb der nächsten Stunden durchlaufen. Der zweite Anstieg der Kurve bedeutet aber den Beginn einer zweiten Welle markierter Mitosen. Eine naheliegende Erklärung wäre das Vorliegen einer gemischten Zellpopulation zum Zeitpunkt der Injektion mit ^3H -Thymidin, d.h. das gleichzeitige Vorkommen zweier aufeinander folgender Generationen von weiblichen bzw. männlichen Gonien. Während der erste Kurvenanstieg auf Mitosen der letzten und vorletzten Gonien-Generation zurückzuführen wäre, würde die zweite Mitosewelle vorwiegend durch Zellen der letzten Generation verursacht, die zur gleichen Zeit, jedoch schon einen Zellzyklus vorher mit ^3H -Thymidin markiert worden wären.

Auch die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Kurven dürften mit größter Wahrscheinlichkeit "Mischkurven" sein, d.h. auf der Auswertung markierter Metaphasen von Oogonien bzw. M-Prospermatogonien mit unterschiedlichem Stellenwert und mithin auf der "Überlagerung" von zwei aufeinander folgenden Generationen beruhen, die eine sehr ähnliche Kinetik besitzen. Die Beobachtung von Hilscher et al. (1974), wonach zur gleichen Zeit verschieden weit entwickelte Stadien der weiblichen Geschlechtszellen vorkommen (Tabelle 3) sowie die festgestellte "Überlagerung" von markierten Mitosen der letzten und vorletzten Generation von Oogonien bzw. M-Prospermatogonien nach einer Injektion von ^3H -Thymidin am 17. Tag p.c. legen diesen Schluß nahe.

Die Kurven der vorliegenden Studie lassen sich mit den Kurven von Hilscher und Hilscher (1978) vergleichen. Letztere (Fig. 6b) wurden nach der Methode der markierten Mitosen erstellt, indem 22 weibliche und 22 männliche Feten von elf Muttertieren am 17. Tag p.c. eine einmalige intraperitoneale Injektion von ^3H -Thymin erhielten und danach im Abstand von 2 bis 22 Stunden getötet wurden. In Fig. 7 a und b ist zu sehen, daß im Vergleich zu den Kurven der vorliegenden Arbeit die von Hilscher und Hilscher erstellte Kurve markierter Metaphasen von Oogonien steiler abfällt und daß die Kurve markierter Metaphasen von M-Prospermatogonien sowohl steiler ansteigt als auch steiler wieder abfällt. Dabei ergibt sich für die Oogonien eine S-Phasen-Dauer von 10.0 h nach dem "halbe Höhe-Verfahren" bzw. von 9.9 h nach dem "Fläche unter Kurve-Verfahren". Für die M-Prospermatogonien erhält man nach diesen beiden Verfahren einen Wert von 10.1 h für die S-Phasen-Dauer. Da die Kurven von Hilscher und Hilscher kein zweites Maximum aufweisen, wurde die Generationszeit nach dem von Hempel (1968) vorgeschlagenen Verfahren berechnet: wenn man den Abstand zweier einander auf der Ordinate entsprechender Punkte der beiden ansteigenden Schenkel einer Kurve mißt, kann man auf der Abszisse die Dauer der minimalen Generationszeit $T_{\min}$ ablesen. Sowohl für die weiblichen als auch für die männlichen Gonien fanden Hilscher und Hilscher eine $T_{\min}$ von 16.5 h.

Vergleicht man die gefundenen Werte für die S-Phasen-Dauer der Arbeit von Hilscher und Hilscher (1978) mit denen der vorliegenden Arbeit, so sieht man, daß die Gonien vor dem 17. Fetaltag eine längere S-Phasen-Dauer zu haben scheinen als die Gonien nach dem 17. Fetaltag. Das widerspricht jedoch den bisherigen Untersuchungsergebnissen an Geschlechtszellen, wonach die Dauer der S-Phase mit steigendem Alter und Differenzierungsgrad der Zellen zunimmt (Monesi 1962, Hochereau de Reviers 1967, Hilscher, Hilscher, Maurer 1969). Für diesen Widerspruch konnte keine Erklärung gefunden werden. Sie muß daher weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Sowohl vor als auch nach dem 17. Tag p.c. ergibt sich für die M-Prospermatogonien eine längere S-Phasen-Dauer als für die weibliche Paralleelpopulation. Ob diese Tatsache als Indiz für einen höheren Differenzierungsgrad der M-Prospermatogonien zu werten ist oder lediglich auf biologischen Schwankungen beruht, kann aufgrund der bisherigen Studien nicht sicher entschieden werden.

Hempel (1968) fand, daß die einzelnen Wellen von Kurven, die nach der Methode der markierten Mitosen erstellt worden waren, immer flacher und breiter wurden. Er erklärte dieses Ergebnis damit, daß sich die durch eine einmalige Injektion mit ^3H -Thymidin markierten Zellen, die eine teilsynchronisierte Subpopulation bilden, innerhalb weniger Generationen gleichförmig über alle Phasen des Generationszyklus verteilen. Es läge somit

nahe, daß eine Aufhebung der Teilsynchronisation bei Verlängerung des zeitlichen Abstands zwischen der Injektion von ^3H -Thymidin und der Tötung der Tiere deutlich erkennbar würde. In der vorliegenden Arbeit verläuft die zweite Welle der Kurven jedoch nur unwesentlich flacher als die erste. Eine Erklärung hierfür wäre die Annahme, daß bei den Geschlechtszellen der Ratte die oben beschriebene Teilsynchronisation über viele Generationen erhalten bleibt, wie dies u.a. bei den Spermatogonien der adulten Ratte gezeigt werden konnte (Hilscher und Hilscher 1969).

Die berechnete Growth-Fraction von 77.7 % für die Oogonien bzw. 75.7 % für die M-Prospermatogonien der Feten des ersten Wurfs, dessen Muttertier eine Stunde vor der Tötung ^3H -Thymidin erhalten hatte, könnte bedeuten, daß sich 22.3 % bzw. 24.3 % der Geschlechtszellen nicht weiter vermehren. Wie aus der Arbeit von Hilscher et al. (1974, Tabelle 3) hervorgeht, kann bei weiblichen Ratten am 17. Fetaltag bereits ein beträchtlicher Prozentsatz der Geschlechtszellpopulation aus Oocyten bestehen. Die überwiegende Anzahl der Oocyten befindet sich zu diesem Zeitpunkt in der G_1 -Phase, die etwa zehn Stunden dauert, d.h. die Oocyten sind weitgehend unmarkiert. Daraus folgt, daß der Anteil markierter Interphasen der Oogonien in Wirklichkeit höher liegt als die Zählungen ergeben haben. Entsprechendes kann man auch für die männlichen Paralleelpopulationen, die M-

Prospermatogonien bzw. T_1 -Prospermatogonien, annehmen, da die G_1 -Phase der T_1 -Prospermatogonien bis zum fünften Tag post natum dauert. Die 22.3 % bzw. 24.3 % zur non-Growth-Fraction gehörenden Geschlechtszellen dürften sich somit zum überwiegenden Teil aus den am weitesten entwickelten Zellen der am 17. Fetaltag vorliegenden Mischpopulation und zu einem kleineren Teil aus degenerierten Oogonien bzw. M-Prospermatogonien zusammensetzen. Dafür sprechen auch die relativ hohen Prozentsätze von 11.4 % postmitotischen Geschlechtszellen bei den weiblichen bzw. 14.2 % bei den männlichen Tieren. Bei diesen postmitotischen Geschlechtszellen dürfte es sich überwiegend schon um Oocyten bzw. T_1 -Prospermatogonien handeln. Der Anteil degenerierter Zellen beträgt in der vorliegenden Studie bei den Oogonien 3.8 %, bei den M-Prospermatogonien 8.5 %.

Zusammenfassung

Mit einem modifizierten Verfahren der Methode der markierten Mitosen von Quastler und Sherman (1959) wurden die Dauer der DNA-Synthese-Phase (S-Phase) und der Generationszeit (T_c) von Oogonien bzw. M-Prospermatogonien in der Zeit zwischen den Tagen 15.6 post conceptionem (p.c.) und 17.0 p.c. untersucht. Bei dem angewandten Verfahren wurden die Tiere stets am 17. Tag p.c. um zwölf Uhr mittags getötet, während ^3H -Thymidin in wechselnden Abständen (1 bis 34 Stunden) vor diesem Zeitpunkt injiziert worden war. Die Auswertungen der Kurven markierter Metaphasen der weiblichen und männlichen Gonien ergaben etwas höhere Werte für die Dauer von S-Phase und Generationszeit, als sie von Hilscher und Hilscher (1978) für Oogonien bzw. M-Prospermatogonien in der Zeit zwischen den Tagen 17.0 p.c. und 17.9 p.c. gefunden worden waren, lagen aber in der gleichen Größenordnung wie diese: so ergaben die Untersuchungen von Hilscher und Hilscher für die Oogonien einen Wert von 9.9 h für die Dauer der S-Phase bzw. von 16.5 h für die Dauer der Generationszeit und für die M-Prospermatogonien einen Wert von 10.1 h für die Dauer der S-Phase bzw. von 16.5 h für die Dauer der Generationszeit. In der vorliegenden Studie dagegen lag für die weiblichen Gonien die S-Phasen-Dauer bei 11.8 h und die Dauer von T_c bei 17.3 h, für die männlichen Gonien betrug die S-

Phasen-Dauer 12.9 h und die Dauer von T_c 16.9 h. Die gefundenen Unterschiede bedürfen der Klärung durch spätere Untersuchungen.

Literatur
=====

Baker, G.T.: Gametogenesis.

Acta endocr. (Kbh.), Suppl. 166, 13-41 (1972)

Bucher, O.: Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen.

Huber Verlag, Bern, 9. Aufl., S. 380 (1977)

Falin, L.I.: The development of genital glands and the origin of germ cells in human embryogenesis.

Acta ant. (Basel) 72, 195-232 (1969)

Hempel, K.: Analyse des Zellcyclus der Melanocyten des Harding-Passey-Melanoms der Maus unter besonderer Berücksichtigung der "Growth-Fraction".

Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 1, 15-30 (1968)

Hilscher, W., Hilscher, B.: Autoradiographische Untersuchungen über die Kinetik der Spermatogenese der Wistarratte unter besonderer Berücksichtigung der Spermatocytogenese.

Z.Zellforsch. 96, 625-640 (1969)

Hilscher, B., Hilscher, W., Maurer, W.: Autoradiographische Untersuchungen über den Modus der Proliferation und Regeneration des Samenepithels der Wistarratte.

Z.Zellforsch. 94, 593-604 (1969)

Hilscher, B., Hilscher, W., Delbrück, G., Lerouge-Bénard, B.: Autoradiographische Bestimmung der S-Phasen-Dauer der Gonocyten bei der Wistarratte durch Einfach- und Doppelmarkierung.

Z.Zellforsch. 125, 229-251 (1972)

Hilscher, B., Hilscher, W., Bülthoff-Ohnolz, B., Krämer, U., Birke, A., Pelzer, H., Gauss, G.: Kinetics of gametogenesis. I. Comparative histological and autoradiographic studies of oocytes and transitional prospermatogonia during oogenesis and prespermatogenesis.

Cess Tiss. Res. 154, 443-470 (1974)

- Hilscher, W., Hilscher, B.: Kinetics of the male gametogenesis.
Andrologia 8, 105-116 (1976)
- Hilscher, W., Schulze, C.: Kinetik und Morphologie der perinatalen Geschlechtszellen bei der Ratte unter besonderer Berücksichtigung der T₁-Prospermatogonien.
Verh. Anat. Ges. 72, 535-538 (1978)
- Hilscher, B., Hilscher, W.: Kinetics of gametogenesis.
II. Comparative autoradiographic studies of oögonia and multiplying prospermatogonia of the Wistar rat.
Cell Tiss. Res. 190, 61-68 (1978)
- Hilscher, W., Brandenbusch, I.: Enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen der Oögonien und M-Prospermatogonien der Ratte.
74. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft in Regensburg, 26.-30. März 1979
- Hochereau de Reviers, M.T.: Synthèse de l'ADN au cours des multiplications et du renouvellement de spermatogonies chez le taureau.
Arch. Anat. Microsc. Morph. exp. 56, Suppl. 3-4, 85-96 (1967)
- Hollweg, S.: Autoradiographische Bestimmung der Dauer der DNS-Verdopplung und des Generationszyklus, sowie der anderen Teil-Phasen des Zyklus bei fetalen Zellarten der Ratte.
Inaug. Diss. Köln (1966)
- Leblond, C.P., Clermont, Y.: Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 55, 548-573 (1952)
- Mendelsohn, M.L.: Autoradiographic analysis of the cell proliferation in spontaneous breast cancer of C3 mouse. III. The growth fraction.
J. nat. Cancer Inst. 28, 1015-1029 (1962a)
- Monesi, V.: Autoradiographic study of DNA synthesis and the cell cycle of spermatogonia and spermatocytes of mouse testis using tritiated thymidine.
J. Cell Biol. 14, 1-18 (1962)

- Oakberg, E.F.: A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal.
Amer. J. Anat. 99, 391-414 (1956)
- Post, J., Hoffman, J.: Changes in the replication times and pattern of the liver cell during the life cycle of the rat.
Exp. Cell Res. 36, 111-123 (1964)
- Quastler, H., Sherman, F.G.: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse.
Exp. Cell Res. 17, 420-438 (1959)
- Quastler, H.: The analysis of cell proliferation kinetics.
In: Cell proliferation, p. 25, Eds. L.F. Lamerton and R.J.M. Fry. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1963)
- Rauh, W.: Das Chondriom in den ersten Keimzellen der Ratte. Eine Keimbahnuntersuchung.
Zeitschr. f. d. ges. Anat. I. Abt. 89, 271-309 (1929)
- Wartenberg, H.: Spermatogenese - Oogenese: ein cytomorphologischer Vergleich.
Verh. Anat. Ges. 68, 63-92 (1974)
- Wartenberg, H.: Comparative cytomorphologic aspects of the male germ cells, especially of the "gonia".
Andrologia 8, 117-130 (1976)
- Wimber, D.E., Quastler, H.: A C-14- and H-3-thymidine double labeling technique in the study of cell proliferation in Tradescantia root tips.
Exp. Cell Res. 30, 8-22 (1963)

Δt (h)	Stichprobenumfang		Mittelwert		Standardabweichung		Vertrauensbereich	
	Ovar	Testis	Ovar	Testis	Ovar	Testis	Ovar	Testis
1	5	4	16.9	19.3	6.3	4.3	39.8%	35.8%
2	4	6	19.5	18.0	4.8	6.6	39.0%	38.6%
3	6	4	25.7	25.5	2.0	4.4	8.1%	27.6%
4	6	4	42.3	45.5	13.7	3.4	34.0%	11.9%
5	6	6	59.7	58.2	4.2	3.1	7.5%	5.5%
6	6	6	65.3	90.7	7.3	7.2	11.8%	8.4%
7	6	6	82.7	84.2	3.6	4.1	4.6%	5.1%
8	4	6	89.5	96.7	4.8	2.1	8.5%	2.3%
10	6	6	97.3	97.2	1.8	1.9	1.9%	2.1%
12	6	6	88.8	95.7	4.2	4.6	5.0%	5.1%
13	4	6	81.8	76.2	5.4	7.2	10.4%	9.9%
14	4	6	64.3	76.8	6.3	1.3	15.7%	1.8%
15	6	6	65.5	64.2	6.0	3.9	9.7%	6.4%
16	6	4	49.3	60.8	5.1	2.2	10.9%	5.8%
17	5	6	45.8	42.0	5.8	8.2	15.8%	20.5%
18	4	6	28.8	33.8	1.7	5.1	9.4%	15.9%
19	6	6	29.8	30.0	1.2	7.0	4.1%	36.9%
20	6	6	8.5	12.5	2.9	1.9	35.7%	15.8%
21	6	6	30.2	28.5	3.2	5.5	11.1%	20.4%
22	6	6	50.0	48.2	6.8	5.2	14.3%	11.4%
24	6	6	69.3	73.5	8.5	6.2	12.9%	8.8%
26	4	6	94.3	93.0	2.9	2.4	4.8%	2.8%
28	4	6	80.5	83.5	5.3	3.4	10.4%	4.3%
30	4	6	76.7	77.8	3.6	8.1	5.0%	11.0%
32	6	6	62.5	49.7	4.9	4.1	8.3%	8.8%
34	6	4	21.5	21.8	6.2	2.5	30.5%	18.2%

Tabelle 1:

Stichprobenumfang, Mittelwerte, Standardabweichung und Vertrauensbereich der Mittelwerte markierter Metaphasen der weiblichen und männlichen Geschlechtszellen am 17. Tag p.c. 1 bis 34 Stunden nach einmaliger i.p. Injektion von ^3H -Thymidin

Oogonien M-Pro spermatogonien

Mitoseindex	0.12	0.11
Mitosedauer	2.1 h	1.9 h
Generationszeit	17.3 h	16.9 h
S-Phasen-Dauer nach dem halbe Höhe-Verfahren	11.8 h	12.9 h
Fläche unter Kurve- verfahren	11.8 h	12.5 h
Anteil markierter Inter- phasen (Wurf 1)	53 %	56 %
(Wurf 2)	52 %	55 %
Growth-Fraction	77.7 %	75.7 %
Degenerationen	3.8 %	8.5 %
Prophasen, frühe	2.6 %	2.2 %
Prophasen, späte	3.9 %	3.5 %
Metaphasen	4.2 %	3.7 %
Anaphasen	0.3 %	0.9 %
Telophasen	0.6 %	0.8 %
Rekonstruktionsphasen	0.5 %	0.8 %
Postmitosephasen	11.4 %	14.2 %
Interphasen	72.7 %	65.4 %

Tabelle 2:

Übersicht ermittelter Werte an weiblichen und männlichen Geschlechtszellen am 17. Tag p.c.

Degenerated		63	6	10	48	30	15	10	14	106	238	250	268	195
O o o c y t e	Dictyote											170 410	280 421	252
	Diplotene								3	179	283	71	24	
	Pachytene			AM 59	50	26	25	207	66	53	73	14		
	Zygotene			1	806	96	51	15						
	Leptotene			6	29	29	5	4	2					
	Preleptotene			13	2									
	Postmitotic													
	Oogonia	n	9	23										
		744	467	190	7									
		16	17	18	19	20	21	22	0	1	2	3	4	5 d

Tabelle 3:

Entwicklung der weiblichen Geschlechtszellen zwischen den Tagen 16 p.c. und 5 p.p.

Degenerierte: Anzahl nicht identifizierter degenerierter Geschlechtszellen

Fett gedruckt: Anzahl intakter Geschlechtszellen

Klein gedruckt: Anzahl identifizierter degenerierter Geschlechtszellen

AM: Anzahl sogenannter atretischer Mitosen

Mittelwerte aller Würfe

(Hilscher et al. 1974)

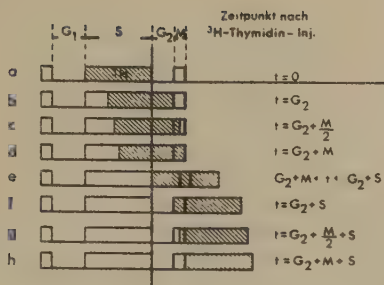


Fig. 1

Schema zur Erläuterung des $^{119}\%$ markierte Mitosen"-Verfahrens (Hollweg 1966)

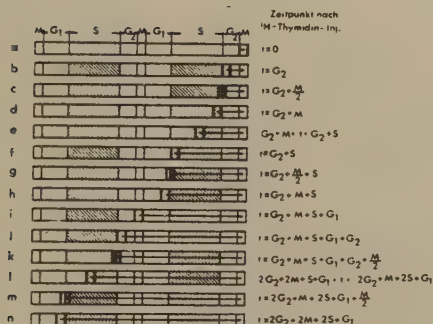
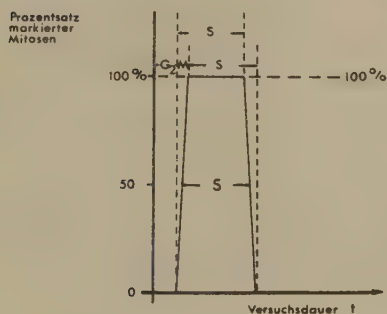
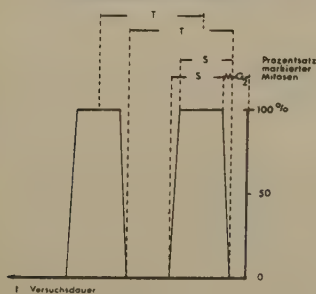


Fig. 2

Schema zur Erläuterung des modifizierten Verfahrens der Methode der markierten Mitosen



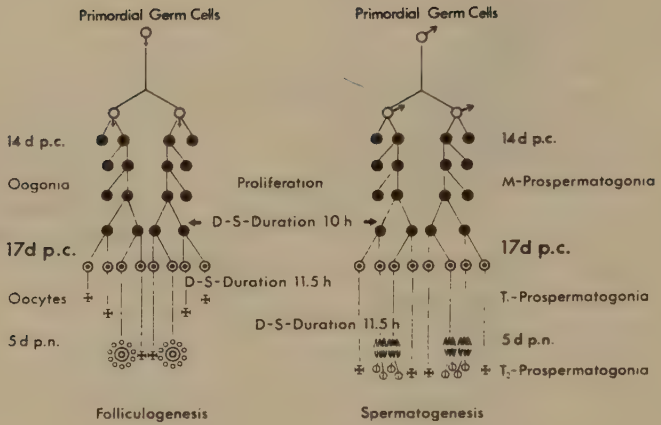


Fig. 3: Kinetik der weiblichen und männlichen Geschlechtszellen der Ratte während der Oogenese und Prä spermatogenese

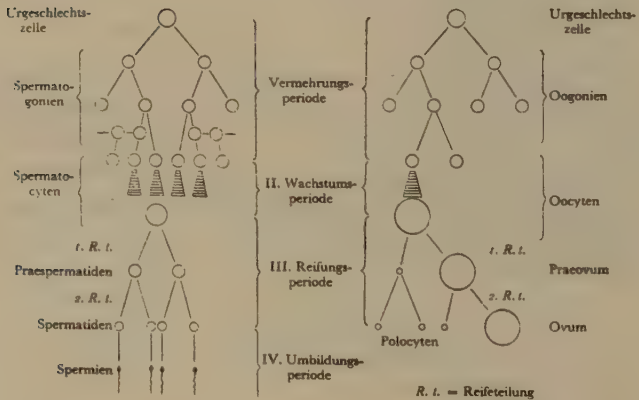


Fig. 4: Schematische Darstellung zum Vergleich der Spermatogenese und der Oogenese (Bucher 1977)

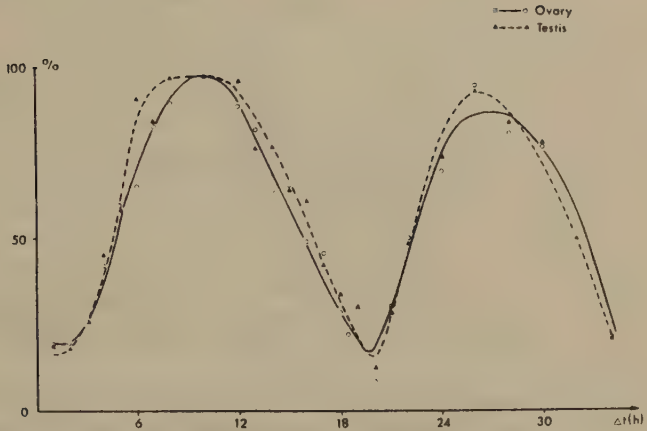


Fig. 5: Mittelwerte der Prozentsätze markierter Metaphasen von Oogonien und M-Prospermatogonien am 17. Tag p.c. zu verschiedenen Zeitpunkten nach i.p. Injektion von ^3H -Thymidin (bis zu 34 Stunden vor der Tötung)

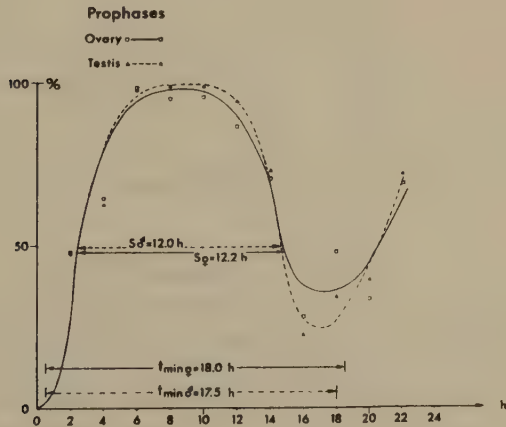


Fig. 6a: Mittelwerte der Prozentsätze markierter Prophasen von Oogonien und M-Prospermatogonien zu verschiedenen Zeitpunkten nach i.p. Injektion am 17. Tag p.c. bis zu 22 Stunden nach der Injektion (Hilscher, Hilscher 1978)

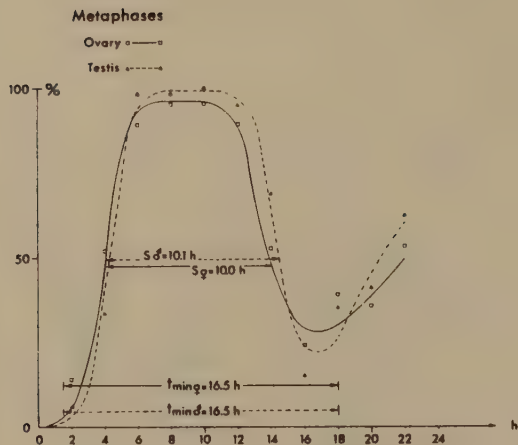


Fig. 6b: Mittelwerte der Prozentsätze markierter Metaphasen von Oogonien und M-Prospermatogonien zu verschiedenen Zeitpunkten nach i.p. Injektion am 17. Tag p.c. bis zu 22 Stunden nach der Injektion (Hilscher, Hilscher 1978)

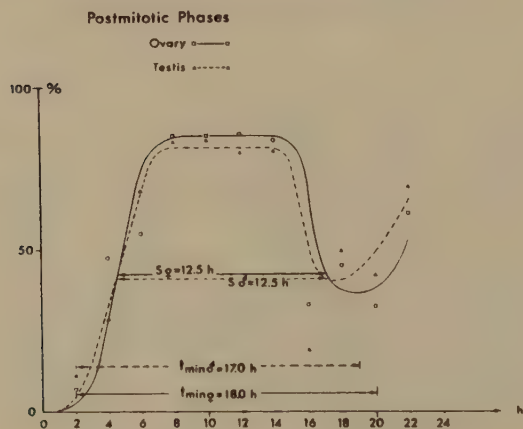


Fig. 6c: Mittelwerte der Prozentsätze markierter Postmitosephasen von Oocyten und T_1 -Prospermatogonien zu verschiedenen Zeitpunkten nach i.p. Injektion am 17. Tag p.c. bis zu 22 Stunden nach der Injektion (Hilscher, Hilscher 1978)

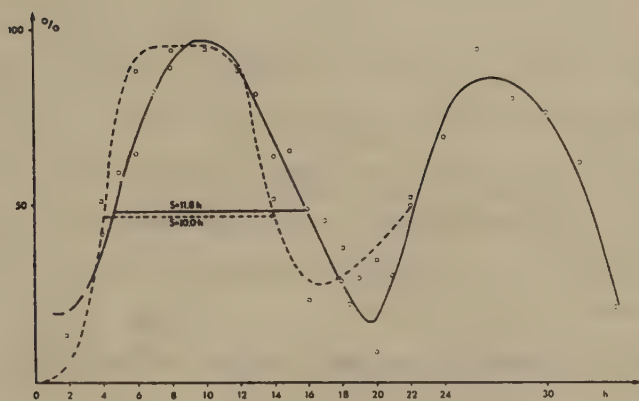


Fig. 7a: Vergleich der Kurvenverläufe markierter Metaphasen von Oogonien aus Fig. 5 und Fig. 6b

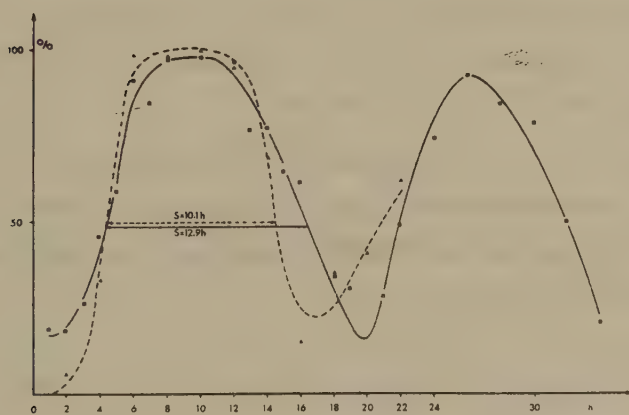


Fig. 7b: Vergleich der Kurvenverläufe markierter Metaphasen von M-Prospersmatogonien aus Fig. 5 und Fig. 6b

Herrn Professor Dr. H.W. Schlipköter möchte ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. W. Hilscher für die Überlassung des Themas, die Anleitung zu wissenschaftlichem Arbeiten und die unermüdliche Bereitschaft zu konstruktiver Kritik.

Frau B. Hilscher danke ich herzlich für ihre stets geduldige und freundliche Hilfe.

Bei Frau Grover, die sich von Beginn der Experimente an intensiv um mich kümmerte, möchte ich mich ganz besonders bedanken.

Bei der statistischen Auswertung der Experimente waren mir in dankenswerter Weise Frau Krämer und Frau Bauer behilflich.

Nicht zuletzt gilt mein Dank den Mitarbeitern der Abteilung für Experimentelle Pathologie des Institutes für Lufthygiene und Silikoseforschung sowie den Damen der phototechnischen Abteilung.

Lebenslauf

=====

29.8.1955	geboren in Düsseldorf als einzige Tochter des Lehrerehepaars Gisela Hellmich, geb. Irrgang, und Horst-Siegfried Hellmich
1962 - 1966	Besuch der Martin-Luther-Schule
1966 - 1970	Besuch des neusprachlichen Mädchen-gymnasiums Helene Lange in Düsseldorf
April 1970	Umzug nach Frimmersdorf/Grevenbroich
1970 - 1973	Besuch des Kreisgymnasiums Grevenbroich bis zum Abitur
seit WS 1973	Medizinstudium an der Universität Düsseldorf
seit 1974	Mitglied der Studienstiftung des deutschen Volkes
August 1975	Ärztliche Vorprüfung
August 1976	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
August 1978	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
seit April 1979	verheiratet mit Egbert Brandenbusch

